

中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，

其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2003 年 05 月 16 日
Application Date

申請案號：092113393
Application No.

申請人：杏輝藥品工業股份有限公司
Applicant(s)

局長
Director General

蔡練生

發文日期：西元 2003 年 8 月 13 日
Issue Date

發文字號：09220816490
Serial No.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：

※ 申請日期：

※IPC 分類：

壹、發明名稱：(中文/英文)

用於提昇免疫力的醫藥組合物及茯苓萃取物

Pharmaceutical Composition for Enhancing Immunity, and Extract of Poria

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

杏輝藥品工業股份有限公司

Sinphar Pharmaceutical Co., Ltd.

代表人：(中文/英文) 李志文/Tim C.W. Lee

住居所或營業所地址：(中文/英文)

宜蘭縣冬山鄉中山村 84 號

國 籍：(中文/英文) 中華民國/R.O.C.

參、發明人：(共 6 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 林漢欽 / Hang-Ching Lin
2. 曾哲明 / Jerming Tseng
3. 丁秀玉 / Hsiou Yu Ding
4. 張溫良 / Wen-Liang Chang
5. 趙建良 / Chien-Lian Chao
6. 黃信文 / Hsin-Wen Huang

住居所地址：(中文/英文)

1. 台北市水源路 49 號 3 樓之 2
2. 台北市文山區樟新里忠順街 1 段 26 巷 12 弄 4 號 3 樓

3. 台南市東區自強里東門路 3 段 15 號 19 樓之 1
4. 台北市汀州路三段 24 巷 5 弄 71 號 2F
5. 桃園市中正里正光街 149 號
6. 台北市內湖區康樂街 61 巷 6 號 5 樓

國 籍：(中文/英文)

1. 中華民國/R.O.C. ; 2. 中華民國/R.O.C. ; 3. 中華民國/R.O.C. ;
4. 中華民國/R.O.C. ; 5. 中華民國/R.O.C. ; 6. 中華民國/R.O.C.

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎ 本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

伍、中文發明摘要：

一種用以提昇人體免疫力之醫藥組合物，此組合物含羊毛固醇（lanostane）類化合物作為有效成分。本發明亦提供一種提昇人體免疫力的茯苓萃取物，包含 5-60 重量%的羊毛固醇類化合物且實質上不含開環羊毛固醇（secolanostane）類化合物。該萃取物係萃取自多孔菌科植物茯苓菌（*Porea cocos* (Schw) Wolf）之代謝產物或發酵產物或茯苓菌菌絲。

陸、英文發明摘要：

A pharmaceutical composition for enhancing human immunity containing lanostane as a potent component is disclosed. The present invention also discloses an extract of *Poria* free of secolanostane and containing 5-60% of lanostane compounds by weight of the extract. The extract is prepared from *Poreia cocos* (Schw) Wolf, scleroderma or a fermentation product of *Poreia cocos* (Schw) Wolf.

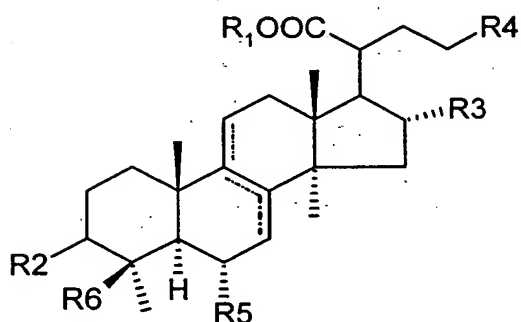
柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

(流程圖未有元件)

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關一種含有羊毛固醇類化合物作為有效成分以提昇人體免疫力的醫藥組合物。本發明亦有關一種可提昇人體免疫力的茯苓萃取物。

【先前技術】

茯苓味性甘淡，有益脾胃，中醫／藥界歸類為鎮靜劑和利尿劑，以及補氣藥處方中的主要成份之一。但依據多年研究和試驗，發現茯苓另具其它療效，包括具抗腫瘤之療效、和有助益於慢性病人的免疫及腸胃系統等。

例如，日本專利第 55-111791 號及第 57-38794 號中，就揭示由人工培養茯苓菌絲體，經萃取成分，用來作為抗腫瘤用途。日本專利第 55-111422 號中，亦揭示由茯苓原材直接萃取成份，用來作為抗腫瘤用途。日本專利第 8-119864 號案，則揭示茯苓原材直接經由甲醇進行萃取，並經過分離後，得到羊毛固醇 (lanostane) 類成分及及開環羊毛固醇 (secolanostane) 類成分等三帖類化合物，用來作為鎮吐劑用途。日本專利第 9-025232 號公開案，又揭示日本產地之茯苓經甲醇萃取分離後，得到三帖類化合物，可作為促癌生成作用的抑制劑。日本專利第 9-176184 號中，再揭示將茯苓甲醇萃取後，再分離精製成三帖類化合物，可作為抗炎及促癌生成作用抑制劑。

而中國第 1008183 號專利，揭示一種製造含三帖類化

合物的茯苓萃取物的方法，以茯苓粉末經酸性酒精溶劑萃取後，並用酸鹼方式抽提處理，所製得茯苓萃取物具抗腫瘤及免疫活化作用的生物活性。

【發明內容】

本發明之主要目的即在提供一種從茯苓製備具有改善的生物活性的有效成分的方法及含有該有效成分的茯苓萃取物。

本發明之另一目的即在提供一種從茯苓製備具有改善的提昇哺乳類動物免疫力的有效成分的方法及含有該有效成分的茯苓萃取物。

本發明之另一目的即在提供一種羊毛固醇(lanostane)用於提昇哺乳類動物免疫力的新用途。此用途的一具體例子為一提昇免疫力的醫藥組合物。本發明的醫藥組合物可含單一或二種以上的羊毛固醇化合物，可使用於免疫調節或增強用途，而且其劑型可以是經皮吸收、口服劑型、注射劑型或緩釋劑型。

本發明以免疫試驗來確認茯苓粗萃取物中具有醫療活性的有效成分就是低極性部位(PCM)，而且PCM所含主要化合物為K1、K2、K3、K4及微量K4a、K4b、K5、K6a、K6b，均為羊毛固醇(lanostane)類化合物，該PCM中含量較高之K1、K2、K3、K4均具有增強免疫之效能。

本發明所揭示之從茯苓製備具有改善的生物活性的有效成分的方法，係利用傳統萃取法萃取茯苓得到一粗萃取

物，再經由層析法，分成極性小之羊毛固醇(lanostane)類部位(以二氯甲烷：甲醇(96:4)為沖提液)和極性大之開環羊毛固醇(secolanostane)類部位(以二氯甲烷：甲醇(90:10或0:100)為沖提液)，其中，利用矽膠薄層層析法，顯示出羊毛固醇(lanostane)類部位之所在位置，即展開溶媒為二氯甲烷－甲醇(96:4)時，層析值(Rf)為 ≥ 0.1 ；至於開環羊毛固醇(secolanostane)類成分，則層析值小於0.1。用矽膠管柱層析法可進一步分離該羊毛固醇類部位，其中沖提液使用二氯甲烷：甲醇(97:3至95:5)，分離出數種羊毛固醇(lanostane)類化合物。

依據本發明之製備方法，每公斤茯苓可製得2.6克PCM。前述中國專利第1008183號的製法每公斤茯苓可製得3克的粗萃取物，若將該粗萃取物以本發明方法進一步純化僅可製得1克PCM。

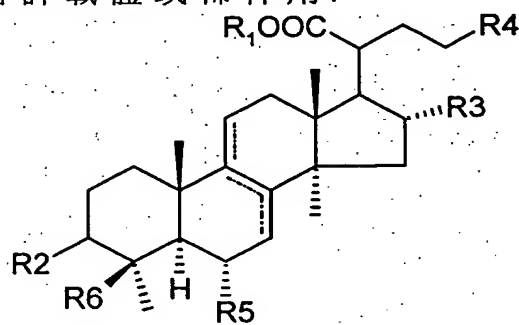
【實施方式】

根據申請人重複中國第1008183號專利之實驗，以中國雲南產地之茯苓，經酸鹼處理方式萃取，平均一公斤茯苓可得3g茯苓三帖類粗萃取物(符合該專利所揭示之範圍 $2.5\text{g} \pm 0.5\text{g}$)。但申請人再經層析，可得1g的低極性部位PCM，進一步分離可得純化之羊毛固醇(lanostane)類成分約400 mg。換言之，按照中國專利之所製得的萃取物其羊毛固醇部位(lanostane fraction)類成分佔萃取物約13%，萃取物之百分之八十七係開環羊毛固醇部位

(secolanostane fraction)及其他未鑑定出之化合物。

經過本案發明人進一步試驗結果，發現羊毛固醇(lanostane)對人體無毒性作用，而且具有療效。但開環(A環)羊毛固醇(secolanostane)，卻對人類細胞呈毒性作用，不適合人類需要和服用。

本發明揭示一種提昇哺乳類動物(例如人類)免疫力的醫藥組合物，包含一提昇哺乳類動物免疫力有效量作為有效成分的具下列化學式(I)的羊毛固醇；及與該有效成分共同使用之醫藥容許載體或稀釋劑：



(I)

於式中 R_1 為H或 CH_3 ； R_2 為 $OCOCH_3$ ， $C=O$ 或 OH ； R_3 為H或 OH ； R_4 為 $-C(=CH_2)-C(CH_3)_2R_a$ ，其中 R_a 為H或 OH ，或 $-CH=C(CH_3)-R_b$ ，其中 R_b 為 CH_3 或 CH_2OH ； R_5 為H或 OH ；及 R_6 為 CH_3 或 CH_2OH 。

較佳的，該醫藥組合物含有1-60重量%的羊毛固醇。

較佳的，該醫藥組合物為口服的。

本發明亦揭示一種提昇哺乳類動物免疫力的茯苓萃取物，包含5-60重量%，較佳的10-20重量%，前述羊毛固醇(I)且實質上不含開環羊毛固醇。

一適合用於製備該茯苓萃取物的方法包含下列步驟：

- a)以一水，甲醇，乙醇或它們的混合溶劑萃取茯苓菌的代謝物，茯苓菌的發酵產物或茯苓菌菌絲；
- b)濃縮步驟a)萃取所獲得的液體；
- c)將步驟a)所獲得的濃縮物導入一矽膠管柱；
- d)以一低極性沖提劑(eluent)沖提該矽膠管柱，及收集所產生的溶離液(eluate)；及
- e)濃縮步驟d)的溶離液。

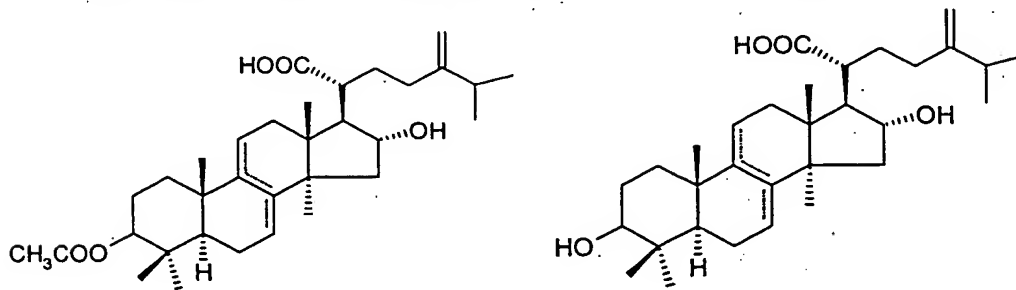
較佳的，從步驟e)所獲得的溶離液的濃縮物以矽膠薄層層析法分析具有一層析值(Rf) ≥ 0.1 ，其中以紫外光燈及碘作檢側，展開液為二氯甲烷：甲醇 = 96:4。

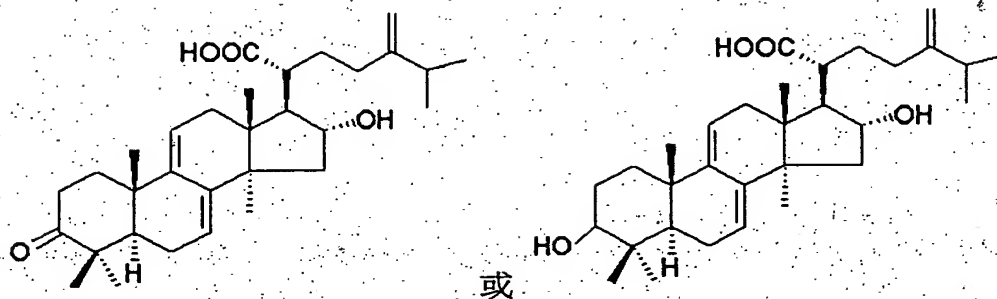
較佳的，步驟a)的萃取所使用的溶劑為95%酒精。

較佳的，步驟b)的濃縮物被進一步以一體積比為1:1的甲醇及正己烷的兩相溶劑萃取；分離出甲醇層；及濃縮該甲醇層，所獲得的濃縮物被用作為步驟c)的矽膠管柱的進料。

較佳的，步驟d)的低極性沖提劑為體積比為96.5:3.5的二氯甲烷及甲醇的混合溶劑。

較佳的，該羊毛固醇(I)具有具下列化學式：





本發明還提供具上述化學式(I)的羊毛固醇作為活性成分在製備提昇哺乳類動物免疫力藥物中的應用。

本發明還提供本發明的茯苓萃取物作為活性成分在製備提昇哺乳類動物免疫力藥物中的應用。

下面結合實施例對本發明做進一步詳細的描述，但不以此限制本發明。

實施例一

請參閱第一圖所示之流程圖。以雲南產茯苓 30 公斤，磨成粉後，利用 120 L 酒精(濃度 95%)萃取 24 小時，及過濾分離。再重複前述萃取及固液分離三次。合併濾液，並將之濃縮後得乾燥萃取物 265.2 克。再利用一兩相萃取劑(己烷：95%甲醇 = 1：1)對該乾燥萃取物進行分配萃取。取出甲醇層並加予濃縮後得到乾燥固體 246.9 克。利用矽膠管柱層析對該乾燥固體進行分離，該矽膠管柱填充有該乾燥固體重量 10-40 倍的矽膠，係購自 Merck 公司，Silica gel 60, 70-230 mesh。以二氯甲烷／甲醇混合液作為沖提劑(eluent)，依序以 96:4、90:10、0:100 比例的混合液進行沖提，溶離液(eluate)以矽膠薄層層析法(Thin Layer

Chromatography) (紫外光燈及碘作檢測，展開液為二氯甲烷：甲醇 = 96:4) 檢測成分，將相同成分合併。

以二氯甲烷－甲醇(96:4)混合液進行矽膠管柱層析，可得到屬 PCM 部份 78 克，PCM 部份依上述矽膠薄層層析法可明顯看到 6 個跡點。以二氯甲烷：甲醇(90:10)及(0:100)沖提液層析合併可得到 PCW 部份 168 克。

PCM 部份進一步以二氯甲烷：甲醇(96.5:3.5)作為沖提劑進行矽膠管柱層析(同上述矽膠管柱)，溶離液依矽膠薄層層析分析結果可合併得到三個部位，分別為 K1 ($R_f=0.64$)、PCM-1 (含微量 K1, K3 ($R_f=0.55$), K5 ($R_f=0.49$)) 和 PCM-2 (含 K2 ($R_f=0.30$), K4 ($R_f=0.24$), K6 ($R_f=0.19$))。管柱層析所得 K1 部位(3.5 g)，進一步經高效液相層析(碳-C18 管柱、移動相為甲醇-水(90:10))純化可得 K1 成分 3.0 g。

PCM-1 部位利用相同高效液相層析，以甲醇-水(87:13)沖提可得 K3, K5 及微量 K1 成分。K3 成分利用相同高效液相層析，以甲醇-水(84:16)沖提可得 K3 (1.93 g)。K5 成分利用相同高效液相層析，以甲醇-水(93:7)及(91:9)依序純化可得 K5(47.6mg)。

而 PCM-2 之成分，利用相同高效液相層析法，以甲醇-水(87:13)沖提可得 K6 微量成分(K6a+K6b)，K4 微量成分(K4a+K4b)，K2 成分及 K4 成分。後二者 K2 成分及 K4 成分利用相同高效液相層析，以甲醇-水(84:16)沖提分別得 K2 (6.2 g)及 K4 (0.55 g)。

K6 微量成分則利用相同高效液相層析以 MeCN-H₂O(68:32)純化得到 K6a (21.4 mg)及 K6b (90.7 mg)；K4 微量成分則利用相同高效液相層析以甲醇-水 (76:24)純化分離得到 K4a (66.0 mg)及 K4b (86.8 mg)。

上述之 K1 至 K6 化合物，其分析數據如下：

K1:混合物，EI-MS:主成分, 528[M]⁺；微量成分, 526[M]⁺

K1(主成分): ¹³C-NMR (δ c): 35.4 (c-1), 24.5 (c-2), 80.6 (c-3), 38.0 (c-4), 50.7 (c-5), 18.4 (c-6), 26.8 (c-7), 135.0 (c-8), 134.4 (c-9), 37.2 (c-10), 20.9 (c-11), 29.7 (c-12), 48.8 (c-13), 46.3 (c-14), 43.6 (c-15), 26.6 (c-16), 57.3 (c-17), 17.8 (c-18), 19.2 (c-19), 48.6 (c-20), 178.6 (c-21), 31.6 (c-22), 33.2 (c-23), 156.1 (c-24), 34.1 (c-25), 22.0 (c-26), 21.9 (c-27), 28.0 (c-28), 16.8 (c-29), 25.4 (c-30), 107.0 (c-31), 21.1 (CH₃COO-), 170.5 (CH₃COO-)

K1 (微量成分): ¹³C-NMR (δ c): 35.6 (c-1), 24.5 (c-2), 80.6 (c-3), 37.8 (c-4), 49.7 (c-5), 23.1 (c-6), 120.6 (c-7), 142.8 (c-8), 145.8 (c-9), 37.6 (c-10), 117.0 (c-11), 36.3 (c-12), 49.4 (c-13), 45.1 (c-14), 44.4 (c-15), 76.4 (c-16), 57.6 (c-17), 17.6 (c-18), 22.8 (c-19), 48.4 (c-20), 178.5 (c-21), 31.4 (c-22), 33.2 (c-25), 156.0 (c-24), 34.1 (c-25), 22.0 (c-26), 21.9 (c-27), 28.2 (c-28), 17.1 (c-29), 26.5 (c-30), 107.0 (c-31), 21.1 (CH₃COO-), 170.4 (CH₃COO-)

K2:混合物，EI-MS:主成分, 486[M]⁺；微量成分, 484[M]⁺

K2(主成分): ¹³C-NMR (δ c): 36.6 (c-1), 29.1 (c-2), 78.5 (c-3), 40.0 (c-4), 51.4 (c-5), 19.2 (c-6), 27.4 (c-7), 135.4 (c-8), 135.3 (c-9), 37.9 (c-10), 21.4 (c-11), 30.2 (c-12), 49.3 (c-13), 46.7 (c-14), 44.2 (c-15), 77.1 (c-16), 57.8 (c-17), 18.2 (c-18),

19.8 (c-19), 49.2 (c-20), 179.4 (c-21), 32.1 (c-22), 33.7 (c-23), 156.5 (c-24), 34.6 (c-25), 22.5 (c-26), 22.4 (c-27), 29.1 (c-28), 16.8 (c-29), 25.9 (c-30), 107.5 (c-31)

K2 (微量成分): ^{13}C -NMR (δ c): 36.7 (c-1), 29.1 (c-2), 78.5 (c-3), 40.0 (c-4), 49.8 (c-5), 24.3 (c-6), 121.2 (c-7), 143.3 (c-8), 145.2 (c-9), 38.0 (c-10), 118.1 (c-11), 37.2 (c-12), 45.5 (c-13), 49.1 (c-14), 44.8 (c-15), 76.8 (c-16), 58.0 (c-17), 18.1 (c-18), 22.9 (c-19), 48.0 (c-20), 179.4 (c-21), 31.9 (c-22), 33.7 (c-23), 156.5 (c-24), 34.6 (c-25), 22.9 (c-26), 22.4 (c-27), 29.1 (c-28), 16.8 (c-29), 26.8 (c-30), 107.5 (c-31)

K3: mp: 278-280°C

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} + 3^\circ$ (c 0.6, Pyridine)

EI-MS m/z: 482[M] $^+$, ^{13}C -NMR (δ c): 37.5 (c-1), 35.7 (c-2), 216.7 (c-3), 48.3 (c-4), 51.8 (c-5), 24.6 (c-6), 121.4 (c-7), 143.5 (c-8), 145.4 (c-9), 38.2 (c-10), 118.3 (c-11), 36.9 (c-12), 45.7 (c-13), 50.0 (c-14), 44.9 (c-15), 77.2 (c-16), 58.1 (c-17), 18.3 (c-18), 22.7 (c-19), 49.2 (c-20), 179.6 (c-21), 32.0 (c-22), 33.8 (c-23), 156.7 (c-24), 34.8 (c-25), 22.7 (c-26), 22.6 (c-27), 26.3 (c-28), 23.1 (c-29), 27.1 (c-30), 107.8 (c-31)

K4: mp: >300°C

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} + 18^\circ$ (c 0.5, Pyridine)

EI-MS m/z: 484[M] $^+$, ^{13}C -NMR (δ c): 31.4 (c-1), 27.4 (c-2), 76.0 (c-3), 38.6 (c-4), 44.5 (c-5), 24.2 (c-6), 122.0 (c-7), 143.5 (c-8), 147.4 (c-9), 38.6 (c-10), 116.9 (c-11), 37.0 (c-12), 45.9 (c-13), 50.2 (c-14), 45.1 (c-15), 77.3 (c-16), 58.2 (c-17),

18.4 (c-18), 23.7 (c-19), 49.3 (c-20), 179.8 (c-21), 32.1 (c-22), 33.9 (c-23), 156.7 (c-24), 34.9 (c-25), 22.8 (c-26), 22.6 (c-27), 29.9 (c-28), 23.9 (c-29), 27.3 (c-30), 107.9 (c-31)

K4a: mp: 284-287°C

$[\alpha]_D^{24} +44^\circ$ (c 0.5, Pyridine)

EI-MS m/z: 498[M]⁺, ¹³C-NMR (δ c): 35.9 (c-1), 37.1 (c-2), 217.3 (c-3), 53.5 (c-4), 43.9 (c-5), 24.5 (c-6), 121.5 (c-7), 143.7 (c-8), 144.9 (c-9), 37.9 (c-10), 119.0 (c-11), 36.9 (c-12), 45.9 (c-13), 50.0 (c-14), 45.0 (c-15), 77.3 (c-16), 58.2 (c-17), 18.5 (c-18), 23.3 (c-19), 49.4 (c-20), 179.9 (c-21), 32.2 (c-22), 34.1 (c-23), 157.0 (c-24), 34.9 (c-25), 22.8 (c-26), 22.7 (c-27), 19.4 (c-28), 67.5 (c-29), 26.9 (c-30), 107.8 (c-31)

K4b: mp: 230-232°C

$[\alpha]_D^{24} +38^\circ$ (c 0.5, Pyridine)

EI-MS m/z: 542[M]⁺, ¹³C-NMR (δ c):

36.6 (c-1), 25.0 (c-2), 82.1 (c-3), 39.4 (c-4), 56.7 (c-5), 68.9 (c-6), 129.2 (c-7), 142.1 (c-8), 145.8 (c-9), 39.2 (c-10), 117.9 (c-11), 36.9 (c-12), 45.8 (c-13), 49.9 (c-14), 44.9 (c-15), 77.3 (c-16), 58.1 (c-17), 18.4 (c-18), 24.8 (c-19), 49.3 (c-20), 179.9 (c-21), 32.1 (c-22), 33.9 (c-23), 156.7 (c-24), 34.9 (c-25), 22.8 (c-26), 22.7 (c-27), 31.9 (c-28), 18.1 (c-29), 27.1 (c-30), 107.9 (c-31), 22.0 (CH₃COO-), 172.0 (CH₃COO-)

K5: mp: 274-275°C

$[\alpha]_D^{24} + 10^\circ$ (c 0.5, Pyridine)

EI-MS m/z: 454[M]⁺, ¹³C-NMR (δ c):

36.8 (c-1), 29.6 (c-2), 79.0 (c-3), 38.6 (c-4), 50.6 (c-5), 24.3 (c-6), 122.1 (c-7),
143.6 (c-8), 147.3 (c-9), 37.2 (c-10), 117.5 (c-11), 34.1 (c-12), 45.0 (c-13), 51.3
(c-14), 30.8 (c-15), 28.1 (c-16), 48.9 (c-17), 17.4 (c-18), 23.7 (c-19), 49.9 (c-20),
179.9 (c-21), 32.4 (c-22), 27.5 (c-23), 124.3 (c-24), 132.7 (c-25), 26.6 (c-26), 18.6
(c-27), 29.2 (c-28), 17.1 (c-29), 26.7 (c-30)

K6a: mp: 248-250°C

$[\alpha]_D^{24} + 63^\circ$ (c 0.4, Pyridine)

EI-MS m/z: 498[M]⁺, ¹³C-NMR (δ c): 37.1 (c-1), 35.0 (c-2), 219.0 (c-3), 48.4
(c-4), 57.0 (c-5), 68.0 (c-6), 128.6 (c-7), 141.8 (c-8), 144.2 (c-9), 38.3 (c-10), 120.2
(c-11), 36.6 (c-12), 45.8 (c-13), 49.7 (c-14), 44.8 (c-15), 77.2 (c-16), 58.1 (c-17),
18.4 (c-18), 22.7 (c-19), 49.4 (c-20), 179.6 (c-21), 32.1 (c-22), 33.9 (c-23), 156.8
(c-24), 34.9 (c-25), 22.8 (c-26), 22.7 (c-27), 31.5 (c-28), 24.5 (c-269), 26.6 (c-30),
107.9 (c-31)

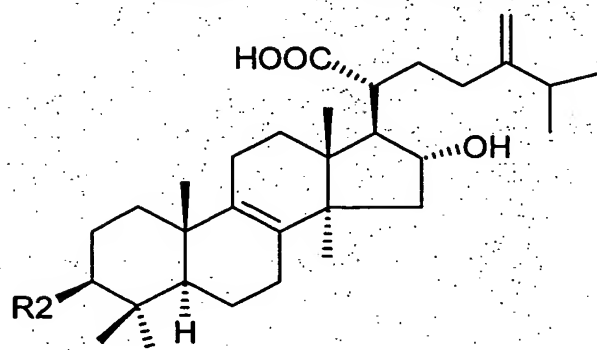
K6b: mp: 267-270°C

$[\alpha]_D^{24} + 68^\circ$ (c 0.3, Pyridine)

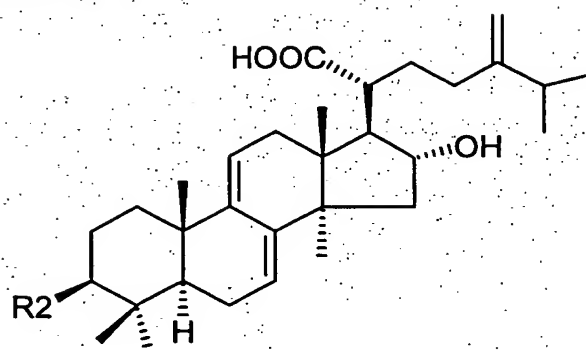
EI-MS m/z: 516[M]⁺, ¹³C-NMR (δ c): 34.4 (c-1), 29.4 (c-2), 74.1 (c-3), 42.6 (c-4),
87.7 (c-5), 133.1 (c-6), 134.7 (c-7), 79.6 (c-8), 145.8 (c-9), 42.1 (c-10), 120.7
(c-11), 36.8 (c-12), 49.1 (c-13), 48.7 (c-14), 42.7 (c-15), 76.8 (c-16), 57.6 (c-17),
19.0 (c-18), 29.3 (c-19), 49.1 (c-20), 179.6 (c-21), 32.2 (c-22), 33.9 (c-23), 156.8
(c-24), 34.9 (c-25), 22.9 (c-26), 22.7 (c-27), 25.1 (c-28), 20.3 (c-29), 20.8 (c-30),

107.9 (c-31)

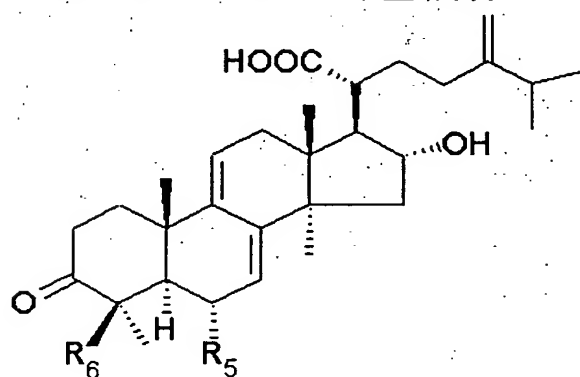
上述之 K1 至 K6 化合物，其結構如下：



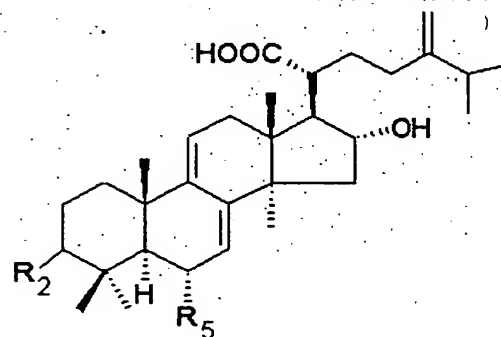
K1: $R_2 = \text{OCOCH}_3$, 主成分
K2: $R_2 = \text{OH}$, 主成分



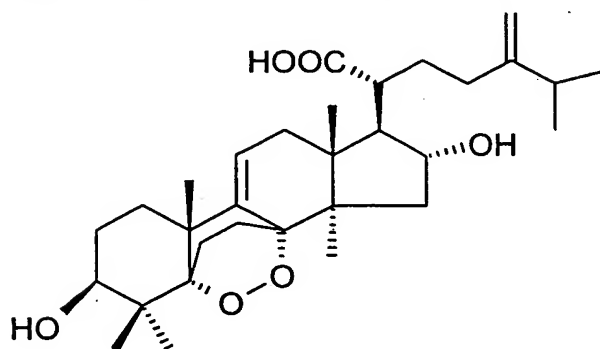
K1: $R_2 = \text{OCOCH}_3$, 微量成分
K2: $R_2 = \text{OH}$, 微量成分



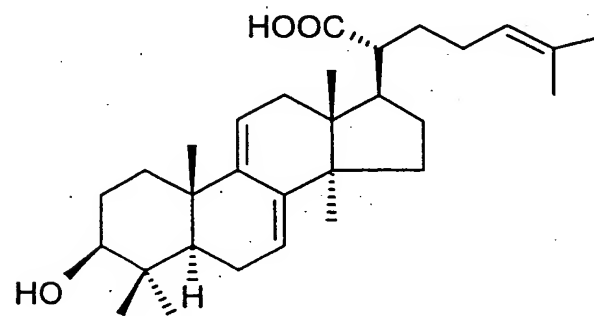
K3: $R_6 = \text{CH}_3$ $R_5 = \text{H}$
K4a: $R_6 = \text{CH}_2\text{OH}$ $R_5 = \text{H}$
K6a: $R_6 = \text{CH}_3$ $R_5 = \text{OH}$



K4: $R_2 = \alpha\text{-OH}$ $R_5 = \text{H}$
K4b: $R_2 = \beta\text{-OCOCH}_3$ $R_5 = \text{OH}$



K6b



K5

實施例二

將 2 公斤與實施例一相同之雲南茯苓粉末，以中國第 1008183 號之方法，參閱第二圖可得萃取物 6.0 克。重覆實施例一步驟對 6.0 g 萃取物進一步以二氯甲烷－甲醇（96:4）混合液作為沖提劑進行矽膠管柱層析，可得到屬 PCM-E 部份 2.0 g。以二氯甲烷：甲醇（90:10）及（0:100）混合液進行沖提，合併可得到 PCW-E 部份 2.3 g。

對照結果

將實施例二之 PCM-E 及 PCW-E，以 40mg/kg/day 口服（餵食）給予動物，分別檢測此二部位成分對動物脾臟細胞（免疫細胞）生長是否有促進作用或者產生抑制作用，如促進細胞增生顯示有利於免疫反應，如抑制細胞增生不利於免疫反應，即對細胞產生毒性作用。

經由下述免疫學研究方法，取得（動物）離體脾臟細胞，培養 5 天，再以 MTT assay 檢測（參考下述免疫學研究方法），比較細胞生長情形。

結果如表一所示，餵食 PCM-E 之小鼠，在第三天及第四天其脾臟細胞有增加情形，在統計上與控制組無顯著差異；不過餵食 PCW-E 之小鼠，其脾臟細胞培養三天及四天後，活細胞數顯著低於控制組，顯示 PCW-E 有細胞毒性，減少存活細胞數。

因此，可說明含羊毛固醇（lanostane）的低極性部位，不具脾臟細胞毒性作用，相反的是有脾臟細胞增加情形；而含開環羊毛固醇（secolanostane）的高極性部位（ $R_f < 0.1$ ）

則為對脾臟細胞有毒性作用。亦即，習知方法所得到的茯苓萃取物含有對脾臟細胞具毒性的極性部位（PCW-E）。

表一 脾臟細胞生長情形-PCM、PCW、PCM-E、PCW-E之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	培養天數(天)		
		3	4	5
控制組		0.608±0.042 ^a	0.777±0.141	0.515±0.055
PCM-E	40	0.890±0.195	0.857±0.137	0.449±0.083
PCW-E	40	0.245±0.072*	0.451±0.020**	0.344±0.132

a：表中數據為5次實驗之Mean±S.E.M；

*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$

由以上實施例及對照例之結果，可證實以下事項：

1. 茯苓的有效成分為含有羊毛固醇(lanostane)類化合物的低極性部位，得用來提昇人體的免疫效果。
2. 有效成分和毒性成分(開環羊毛固醇或其他極性大之分子)，可藉由矽膠薄層層析法鑑定及以矽膠管柱層析法分離。
3. 以本發明之製備方法製得的低極性部位(PCM)含有羊毛固醇類化合物的，且去除開環羊毛固醇類毒性成分，因此提昇免疫力效果及安全性顯著增強，遠優於傳統習知萃取法所萃取出的茯苓萃取物。
4. 上述動物實驗是經由口服吸收後，再檢驗對於脾臟細胞的作用，與傳統利用體外細胞試驗有不同意義。因體外

細胞實驗避開藥物吸收，體內分佈和代謝對藥物之影響，無法反應藥物真正作用，因此，體內實驗意義較體外所顯示意義更為可信賴。

由於免疫反應為一複雜過程，本發明之萃取物及層析純化物，係依據免疫試驗按照下列幾項研究而測得具免疫功能：

1. 由動物之血清中得知抗體變化情形。
2. 利用脾臟細胞（含免疫細胞）測定
 - (1) 淋巴球增加(或減少)；
 - (2) 淋巴球類族群變化；
 - (3) 自然殺手細胞活性；
 - (4) 抗體之分泌；及
 - (5) 細胞激素之分泌。
3. 腹腔巨噬細胞吞噬力。

如實施例一所示，本發明經矽膠管柱層析及高效液相層析，可分離或純化出雲南產茯苓之羊毛固醇類成分，K1、K2、K3、K4、K4a、K4b、K5、K6a及K6b（其中K1及K2因化合物性質，雖使用高效液相層析仍無法分離其內之微量成分），將矽膠層析之K1及高效液相層析所得之K2、K3及K4進行免疫增強研究（如免疫學研究項下），由表二至表十實驗結果，顯示K1、K2、K3及K4化合物在實驗最低濃度（2.5mg/kg或5mg/kg）下，就能對免疫細胞（T細胞/B細胞），出現免疫增強作用。

據此，可確認茯苓的有效成分，係羊毛固醇類成分，

其中 PCM 及主要成分 K1、K2、K3、K4 均具有加強免疫細胞之效能。

研究方法：(免疫學研究)

實驗動物

BALB/c 小白鼠：6-8 週大，雄性，購自國家動物中心，飼養於國立台灣師範大學生物系動物房，飼養環境採用標準無特殊病源動物(SPF)、獨立吹塵式無菌動物籠架(Individual Ventilation Cage System, IVC)，所飼養動物所用的飲水、木屑及飼料皆經高溫高壓滅菌處理，溫度保持在 24-26℃，濕度保持在 30-70%，照明使用定時器以確保規律之光照週期，以一天 12 小時日 12 小時夜循環，飼料購自台大動物中心(粗蛋白 23.5%以上；粗脂肪 4.5%以上；粗纖維 6% 以下；水份 12% 以下；灰份 9% 以上)，飼養兩週後，即進行實驗。

動物處理

動物被分成 4 組(或 3 組)，餵食給藥 1 毫升的萃取物或純化成分，4 天藥物劑量範圍如為 PCM 則劑量為 10、40、80mg/kg/day，如為純化物 K1 及 K2，劑量為上述 4 分之一，即 2.5、5、10、20mg/kg/day，對照控制組則不給藥以而等體積無菌水取代，老鼠在第五天犧牲後，收集其血清及脾臟細胞作研究材料，血清部份則測其抗體，即 IgG、IgM 和 IgA、脾臟細胞則被置入 10 公分直徑之培養皿，然後於 37℃ 下培養 3 小時，去除附著性細胞，非附著性細胞包括

T、B、NK 等細胞，收集後按下列各項實驗指示處理。

藥物處理

茯苓成分加入無菌水，使用超音波處理使成懸浮狀溶液。

分離脾臟淋巴球

經斷頸及 70%酒精噴灑消毒後，先以 23G needle 心臟抽血，待凝血後，離心分離出血清備用，再用剪刀剪開其皮膚及腹膜，取出脾臟。脾臟取出後，打開胸腔，直接由心臟取血，製備血清，以備進一步實驗。另準備一盛有 10ml RPMI-1640 細胞培養液之培養皿，其中放入細胞研磨器，將脾臟置於細網上以研磨器磨碎，使細胞分離而懸浮於培養液中。如此收集到的脾臟細胞自培養皿吸出，裝入 50ml 離心管中，放置離心機，以 1300rpm 離心 10 分鐘。加 1ml cold RBC lysing buffer (EDTA-NH₄Cl)處理 10 分鐘，以去除紅血球。離心清洗三次後，將細胞移至培養皿中，於二氧化碳培養箱(37°C、5%CO₂、100% 飽和濕度)放置三小時，使附著性細胞附著於培養皿上，隨後收集非附著性細胞，其中主要含脾臟淋巴球。

MTT 法

MTT 法是分析細胞存活數或活性常用方法，基本原理是利用活細胞中粒線體的氧化還原酵素對受質作用，產生顏色的變化，再進一步測定其吸光值 (Mosmann, J. Immunol. Method., 65, 55-63(1983))。詳細方法如下：

將分離好的脾臟淋巴球調成 5×10^6 cell/ml，置入

96well 的培養盤中，每 well 加 $100\mu\text{l}$ 。一個 sample 加 5 個格，並每個 well 加入 $1\mu\text{l}$ ConA (1mg/ml) (Sigma, MO. USA)，最後置於 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 100% 飽和濕度培養箱中培養，於第三天、第四天及第五天以 MTT 法測試

方法如下：先加入 MTT 試劑 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma, MO. USA) $20\mu\text{l}$ 後，放在培養箱中作用 4 小時。4 小時後取出培養盤，每個格加入 acid-isopropanol (0.04N HCl in isopropanol) $120\mu\text{l}$ ，充分混合以溶解培養底部深藍色結晶。再置於培養箱 20 分鐘，20 分鐘後以 ELISA 測讀儀 (波長 570 nm) 讀取吸光值，以分析細胞存活數。

酵素免疫分析法測定免疫球蛋白

本研究採用 sandwich ELISA 方法，簡述如下：將分離好的脾臟淋巴細胞懸浮在含 10% 胎牛血清， 2mM glutamine， 100u/ml Penicillin/Streptomycin 及 5ug/ml 脂多醣 (LPS) 的 RPMI 1640 培養基中 (稱為完全培養基)，調成 $5\times 10^5\text{ cell/ml}$ ，細胞隨後置入 24-well 之培養盤中，每格加入 1ml ，在 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 100% 飽和濕度中培養 5 天，然後收集上清液作 ELISA 測試。

1. 測 IgG：

首先將 goat anti-Mouse IgG+A+M (H+L) (Zymed, CA USA)， 1mg/ml 稀釋成 $1/1000$ 加入 96 格的 ELISA plate (Nunc,

Denmark)，每格加入 100 μ l，放在 4°C 中隔夜，翌日，拿出 plate 用 0.05% PBS-Tween20 洗三次，吸乾。以 1%PBS-gelatin 進行 blocking，每格加入 100 μ l，放在 37°C 下作用 60 分鐘。將血清樣品用 RPMI 1640 稀釋十萬倍 ($1/10^5$)，而培養脾臟細胞之上清液樣品則不稀釋。IgG 標準液序列稀釋為：0.25、0.125、0.0625、0.0312、0.0156、0.0078、0.0039、0 μ g/ml 等各濃度。取出放在 37°C 培養箱中之 plate，以 0.05%PBS-Tween20 清洗三次並吸乾，隨後分別加入待測樣品及標準液各 100 μ l，在 37°C 培養箱中作用二小時。拿出 ELISA plate，續用 0.05%PBS-Tween20 清洗三次並吸乾後，再加入 goat anti-mouse IgG-HRP(稀釋 1/1000)每格加入 100 μ l，續於 37°C 中作用 60 分鐘，最後再用 0.05%PBS-Tween20 洗三次，並加入 100 μ l 的受質(0.1% O-phenylenediamine; 0.1M citrate buffer, pH 4.5; 0.03% H_2O_2)，於室溫中作用 30 分鐘。最後用 ELISA reader(主波長 490nm，輔波長 630nm)讀 O.D. 值。參考標準曲線，算出各待測樣品所含 IgG 之濃度。

2. 測 IgM：

IgM 之測試方法與 IgG 相似，血清樣品用 RPMI 1640 稀釋一萬倍 ($1/10^4$)，上清液樣品則不稀釋。IgM 標準液序列稀釋為：1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0312、0.0156、0 μ g/ml 等各濃度。二次抗体使用 goat anti-mouse IgM-HRP(稀釋 1/1000)。

3. 測 IgA：

IgA 測試方法與 IgG 相似，ELISA plate 附上 sheep anti-mouse IgA(稀釋成 1/1000)，血清樣品用 RPMI 1640 稀釋一萬倍(1/10⁴)，上清液樣品則不稀釋。IgA 標準液序列稀釋為 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0312、0 μg/ml 等各濃度。二次抗体使用 goat anti-mouse IgA-HRP(稀釋 1/1000)。

酵素免疫分析法測定細胞激素 (IL-10 及 IFN- γ)

將分離好的脾臟淋巴細胞以完全培養基調成 1×10^6 cell/ml，不過以 ConA (1μ g/ml)取代 LPS，隨後細胞置入 24-well 培養盤中，每格加入 1ml，在 37°C、5% CO₂，100%飽和濕度下培養 3 天，第 3 天取上清液測 IL-10 及 IFN- γ 。

1. 測 IL-10

以 Cyto Set ELISA kit (R & D Systems, MN, USA) 測定之，方法簡述如下：以抗 mIL-10 單株抗體為一次抗體附在 ELISA plate 上，每格加入 100ul 之 mIL-10 標準品濃度由 500 pg/ml 序列稀釋至 15.6 pg/ml 或待測樣品，37°C 中作用 20 分鐘後，以沖洗液沖洗五次，每格再加入 100ul 之 biotinylated conjugated anti-IL-10 (二次抗體)，37°C 中作用 20 分鐘，以沖洗液沖洗五次，每格再加入 100 μl 之 HRP conjugated streptoavidin，37°C 中作用 20min 後，以沖洗液沖洗五次，每格再加入 50 μl 之 substrate solution (含 H₂O₂ 及 tetramethylbenzidine；

TMB)，以 ELISA Reader (450nm)測 O.D 值，再以標準曲線求樣品之 IL-10 濃度。

2. 測 IFN- γ

以 Cyto Set ELISA kit (R & D Systems, MN, USA) 測試方法與 mIL-10 相似，ELISA plate 附上以抗 m IFN- γ 單株抗體(一次抗體)，二次抗體為 biotinylated conjugated anti-IFN- γ ，標準品濃度由 600 pg/ml 序列稀釋至 18.8 pg/ml。

T 細胞 CD4⁺及 CD8⁺次族群分析

將已經收集好的脾臟淋巴球放入 Falcon tube，將細胞調成 1×10^6 cell/ml，加入各 1 μ l 的 Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse CD4、Fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-mouse CD8，在室溫避光環境下作用 15 分鐘後，加入 3ml 無菌冷卻之 PBS，以 1300rpm 離心 10 分鐘，離心後吸除上清液，均勻打散細胞，加入 0.5ml 含 1.0% paraformaldehyde 之冷卻 PBS，並輕微地振盪混合，隨即用流式細胞儀 (Flow cytometry; Becton Dickinson FACS, San, CA)進行螢光陽性細胞比例分析。

自然殺手細胞活性分析

爲了測定動物之自然殺手細胞活性，須先培養自然殺手細胞的目標細胞(YAC-1 細胞株)，將生長良好之 YAC-1

細胞株配製成 1×10^5 cell/ml 加入 2 μ l DiOC18(綠色螢光標示目標細胞)，於二氧化碳於培養箱中培養 20 分鐘。20 分鐘後，取 200 μ l YAC-1(Target cells)及 200 μ l 分離好的脾臟淋巴球(Effector cells)，配成 T:E 比例分別為 1:50、1:25、1:12.5 的細胞混合液，另一管只加 YAC-1 當作負控制組，細胞混合液放入二氧化碳培養箱放置 2 小時，2 小時後加入 50 μ l Propidium Iodide(紅色螢光，滲入死亡細胞中，標示細胞核)，置於冰浴中 10 分鐘，在 4 $^{\circ}$ C 避光環境下立即用流式細胞儀分析。

吞噬細胞活性分析

先製備老鼠腹腔巨噬細胞，方法如下：老鼠犧牲前三天以腹腔注射 10% 2.5ml proteose peptone，三天後斷頸將老鼠致死，用剪刀把腹腔表皮剪開，打入 3.0 ml 無胎牛血清之 DMEM，用鑷子輕拍腹腔約 3 分鐘後，用空針取出腹腔液，以 DMEM 加至 10ml，即以 1300rpm 離心 10 分鐘，收集之腹腔細胞調成 1×10^7 /ml。

一個 sample 準備二根 falcon tube，各加入 100 μ l 巨噬細胞懸浮液，放置冰上 10 分鐘，隨後加入 100 μ l FITC-conjugated *Escherichia coli*(K-12) 5×10^7 cells/ml，兩管中一管放置冰上 15 分鐘(負控制組)，另一管放置 37 $^{\circ}$ C 15 分鐘，作用結束後各加入 100 μ l trypan blue 混合均勻，以 cold PBS 3ml 於 1300rpm 離心 5 分鐘，如此將細胞清洗兩次後，加入 500 μ l 1%paraformaldehyde，

即可用流式細胞儀分析，有吞噬 *E. coli* 之巨噬細胞發出黃綠色螢光。

統計方式

以 Mann-Whitney Rank Sum Test，分析服藥組與控制組之間的關係，P 值 ≤ 0.05 視為顯著差異。

研究結果：

- (1) 脾臟細胞生長情形－PCM、K1、K2、K3 及 K4 之作用
如表二所示，口服 PCM、K1、K2、K3 及 K4 之小鼠脾臟細胞與控制組(餵食無菌水)相較結果：服用 PCM 40mg/kg/day 之小鼠在培養第三天後，活細胞顯著多於控制組。而 K1、K3 及 K4 服用 5mg/kg/day 以上，K2 服用 10mg/kg/day 以上在培養第三天，活細胞顯著多於控制組。

表二~1 脾臟細胞生長情形-PCM, K1, K2 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	培養天數(天)		
		3	4	5
控制組		0.359±0.076 ^a	0.481±0.044	0.414±0.067
PCM	10	0.453±0.028	0.398±0.057	0.301±0.059
PCM	40	0.551±0.040*	0.401±0.031	0.445±0.055
PCM	80	0.475±0.083	0.410±0.083	0.447±0.075
K1	2.5	0.497±0.080	0.533±0.070	0.584±0.060*
K1	5	0.642±0.078**	0.652±0.077	0.469±0.054
K1	10	0.743±0.083**	0.733±0.035***	0.562±0.025*
K1	20	0.634±0.048**	0.571±0.091	0.452±0.049
K2	2.5	0.533±0.069*	0.460±0.052	0.414±0.054
K2	5	0.489±0.087	0.480±0.072	0.527±0.062
K2	10	0.928±0.078***	0.931±0.065***	0.585±0.041*
K2	20	0.655±0.075**	0.605±0.072	0.530±0.057

a：表中數據為 MTT 測試所獲得之 570nm 波長吸光值 (O.D.)；數據為 10 次實驗之 Mean±S.E.M；

*表示 $P < 0.05$ ；**表示 $P < 0.01$ ；***表示 $P < 0.001$

表二~2 脾臟細胞生長情形-K3, K4 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	培養天數(天)		
		3	4	5
控制組		0.373±0.070	0.404±0.033	0.431±0.044
K3	5	1.154±0.172***	0.841±0.160*	0.864±0.194
K3	10	1.020±0.090***	0.900±0.193**	0.957±0.200*
K3	20	1.103±0.081***	1.068±0.132***	0.943±0.159**
K4	5	0.949±0.101**	0.981±0.087***	0.862±0.085**
K4	10	1.198±0.101***	1.273±0.147***	1.177±0.078***
K4	20	1.233±0.040***	1.263±0.041***	1.061±0.124***

a：表中數據為 MTT 測試所獲得之 570nm 波長吸光值 (O.D.)；數據為 6 次實驗之 Mean±S.E.M；

*表示 $P < 0.05$ ；**表示 $P < 0.01$ ；***表示 $P < 0.001$

(2) 血清中免疫球蛋白濃度變化—PCM、K1、K2、K3 及 K4 之作用

如表三所示，口服 40mg/kg/day 以上之 PCM 顯著提昇小鼠血清中 IgG 之濃度，而餵食 K1、K2 及 K4 5mg/kg/day 以上之血清 IgG 濃度顯著高於控制組；相反的，餵食 5mg/kg/day 以上之 K3 則 IgG 血清濃度顯著低於控制組。餵食 PCM 40mg/kg/day、K1 10mg/kg/day、K2 2.5mg/kg/day、K3 5mg/kg/day 及 K4 5mg/kg/day 以上之血清 IgM 濃度顯著高於控制組。口服 80mg/kg/day 之 PCM 顯著抑低小鼠血清中 IgA 之濃度。然而，K1

10mg/kg/day 則顯著提高 IgA 濃度，K2、K3 及 K4 於所測試濃度下對 IgA 並無影響。

表三~1 血清免疫球蛋白濃度-PCM, K1, K2 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	免疫球蛋白濃度(mg/ml)		
		IgG	IgM	IgA
控制組		1.81±0.19 ^a	0.90±0.18	3.67±0.54
PCM	10	2.38±0.28	1.31±0.13	3.40±0.25
PCM	40	4.36±0.88*	1.96±0.18***	2.54±0.28
PCM	80	4.53±0.92*	2.07±0.21***	2.26±0.26*
K1	2.5	1.57±0.32	1.27±0.22	3.51±0.33
K1	5	2.83±0.41*	1.38±0.24	4.03±0.47
K1	10	3.00±0.53**	3.27±0.47***	6.57±0.71**
K1	20	3.74±0.62**	1.46±0.27	3.79±0.35
K2	2.5	1.69±0.24	2.82±0.41***	2.85±0.36
K2	5	2.95±0.17**	3.46±0.61***	2.81±0.28
K2	10	3.75±0.54***	2.58±0.38***	4.33±0.33
K2	20	5.11±0.72***	5.13±0.95***	5.02±0.65

a：表中數據為 10 次實驗之 Mean±S. E. M；*表示 P<0.05，**表示 P<0.01；***表示 P<0.001

表三~2 血清免疫球蛋白濃度-K3, K4 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	免疫球蛋白濃度(mg/ml)		
		IgG	IgM	IgA
控制組		1.80±0.11	1.11±0.13	3.15±0.48
K3	5	1.32±0.09**	1.63±0.11**	3.65±0.26
K3	10	1.28±0.13**	1.53±0.14*	3.81±0.46
K3	20	1.14±0.11**	1.53±0.13*	3.55±0.37
K4	5	3.75±0.18***	2.65±0.21**	3.33±0.13
K4	10	4.33±0.29***	2.86±0.16**	3.39±0.25
K4	20	4.18±0.25***	2.36±0.16**	3.54±0.12

a：表中數據為 6 次實驗之 Mean±S.E.M；

*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ；***表示 $P < 0.001$

(3) 離體培養下，脾臟細胞分泌抗體之能力－PCM、K1、K2、K3 及 K4 之作用

3-1：離體培養下，脾臟細胞分泌 IgG 之能力－PCM、K1、K2、K3 及 K4 之作用，如表四所示，口服 40mg/kg/day PCM 小鼠脾臟細胞培養三天後，IgG 分泌有顯著增加，而 K1 5mg/kg/day 以上及 K2 10mg/kg/day 以上則 IgG 分泌有顯著增加，相反的，K3 5 mg/kg/day 以上 IgG 分泌有顯著抑制，而 K4 5 mg/kg/day 以上，培養至第五天，IgG 分泌有顯著增加。

表四~1 脾臟細胞分泌 IgG(ng/ml)之能力-PCM, K1, K2 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	培養天數(天)		
		3	4	5
控制組		7.40±1.07 ^a	10.00±1.42	11.21±1.31
PCM	10	4.24±0.69	6.00±0.97*	6.46±0.94*
PCM	40	16.37±3.11*	17.42±3.41	13.67±3.73
PCM	80	10.84±3.42	8.67±3.33	9.20±3.18
K1	2.5	19.65±5.73	19.88±5.26	13.34±3.66
K1	5	41.53±8.68***	32.94±8.84***	33.27±6.14**
K1	10	38.43±11.09***	30.01±7.40***	34.49±8.27***
K1	20	59.53±13.04***	65.55±17.30***	70.58±20.47***
K2	2.5	8.32±2.53	15.32±3.67	9.02±2.34
K2	5	5.97±2.70	10.48±3.77	13.34±3.83
K2	10	12.95±2.17*	11.94±2.24	17.97±2.07**
K2	20	25.93±10.15*	27.41±10.98*	22.82±5.96*

a：表中數據為 10 次實驗之 Mean±S.E.M；

*表示 P < 0.05；**表示 P < 0.01；***表示 P < 0.001

表四~2 脾臟細胞分泌 IgG(ng/ml)之能力-K3, K4 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	培養天數(天)		
		3	4	5
控制組		7.17±0.89	12.04±0.46	9.55±0.77
K3	5	3.85±0.73**	3.43±0.40**	4.46±0.95**
K3	10	3.18±0.55**	3.16±0.62**	3.48±0.43**
K3	20	6.12±0.70	7.10±1.39*	8.56±1.34
K4	5	12.55±3.08	12.99±0.86	18.29±0.92**
K4	10	6.54±1.43	15.15±5.16	22.59±5.35*
K4	20	21.23±3.19**	19.11±4.23	22.56±3.84*

a：表中數據為 6 次實驗之 Mean±S.E.M；

*表示 $P < 0.05$ ；**表示 $P < 0.01$ ；

3-2：離體培養下，脾臟細胞分泌 IgM 之能力—PCM、K1、K2、K3 及 K4 之作用如表五所示，口服 40mg/kg/day 以上之 PCM，10 mg/kg/day 以上之 K1 及 K3，2.5 mg/kg/day 以上之 K2，5 mg/kg/day 以上之 K4 小鼠脾臟細胞，從培養第三天起，其 IgM 之分泌量皆顯著高於控制組。

表五~1 脾臟細胞分泌 IgM(ng/ml)之能力-PCM, K1, K2 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	培養天數(天)		
		3	4	5
控制組		138.27±42.55 ^a	171.10±39.90	184.29±30.97
PCM	10	184.37±36.35	251.78±37.64	273.91±33.30
PCM	40	375.07±13.6***	352.16±17.60***	323.52±13.70***
PCM	80	328.96±24.46***	322.79±23.76*	296.89±12.42**
K1	2.5	181.30±34.26	201.03±33.98	190.20±38.67
K1	5	223.32±51.46	233.67±31.32	249.35±38.32
K1	10	356.52±28.8***	362.17±31.1**	527.33±41.00***
K1	20	267.18±58.97	280.79±32.08*	320.44±41.39*
K2	2.5	378.0±55.5***	479.8±60.9***	254.4±30.8
K2	5	457.81±87.3**	507.62±91.9**	334.75±48.7*
K2	10	540.23±68.8***	512.47±84.20***	550.54±50.10***
K2	20	837.1±114.5***	695.2±144.7**	591.5±108.4***

a：表中數據為 10 次實驗之 Mean±S.E.M；

*表示 $P < 0.05$ ；**表示 $P < 0.01$ ；***表示 $P < 0.001$

表五~2 脾臟細胞分泌 IgM(ng/ml)之能力-K3, K4 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	培養天數(天)		
		3	4	5
控制組		121.91±34.35	200.75±32.77	219.30±18.60
K3	5	222.42±42.83	214.45±28.51	277.52±101.63
K3	10	287.66±44.44*	294.30±30.68*	309.51±30.88*
K3	20	372.14±69.48*	519.53±52.63***	606.44±88.10**
K4	5	463.65±76.41***	688.17±85.78***	649.89±70.09***
K4	10	514.45±70.30***	733.58±95.70***	807.32±104.21***
K4	20	747.6±128.42***	746.50±157.76***	857.49±92.19***

a：表中數據為 6 次實驗之 Mean±S. E. M；*表示 $P < 0.05$ ；

表示 $P < 0.01$ ；*表示 $P < 0.001$

3-3：離體培養下，脾臟細胞分泌 IgA 之能力—PCM、K1、K2、K3 及 K4 之作用，如表六所示，口服不同劑量之 PCM 小鼠，脾臟細胞培養三天後，IgA 分泌量顯著低於控制組；相反的，口服 K1 10mg/kg/day，培養第 3 天至第 5 天後 IgA 分泌顯著高於控制組，口服 K2 10mg/kg/day 以上，IgA 分泌顯著高於控制組。口服 5mg/kg/day K3 培養第 4 天之後，IgA 分泌顯著低於控制組，口服 5mg/kg/day K4 培養第 5 天之後，IgA 分泌顯著高於控制組

表六~1 脾臟細胞分泌 IgA(ng/ml)之能力-PCM, K1, K2 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	培養天數(天)		
		3	4	5
控制組		130.48±30.76 ^a	144.72±31.06	128.56±35.52
PCM	10	50.67±13.28**	66.09±8.68*	74.73±15.17
PCM	40	84.31±8.09	94.72±10.64	125.41±8.51
PCM	80	36.03±4.10**	46.16±5.09**	56.05±7.71*
K1	2.5	118.64±19.79	94.65±53.54	108.37±16.01
K1	5	148.60±24.55	127.93±66.0	148.81±22.97
K1	10	432.11±48.1***	378.5±196.2***	422.74±76.67**
K1	20	145.93±26.52	144.08±84.36	179.0±18.86
K2	2.5	133.90±33.39	181.00±47.98	277.13±101.1
K2	5	155.67±18.66	142.89±26.86	94.91±12.07
K2	10	239.64±43.1*	258.20±46.4*	260.00±40.93*
K2	20	273.20±54.87*	211.48±57.82	324.7±153.4**

a: 表中數據為 10 次實驗之 Mean±S. E. M; *表示 P < 0.05;

表示 P < 0.01; *表示 P < 0.001

表六~2 脾臟細胞分泌 IgA(ng/ml)之能力-K3, K4 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	培養天數(天)		
		3	4	5
控制組		58.21±12.63	66.92±17.16	73.41±14.64
K3	5	32.83±7.00	27.37±5.83*	21.96±4.17**
K3	10	26.57±3.68*	28.97±5.95*	18.87±2.66**
K3	20	43.08±4.05	43.45±5.92	30.50±3.60*
K4	5	55.56±4.71	79.51±3.74	106.69±7.29*
K4	10	66.43±5.26	95.39±10.08	121.97±12.69*
K4	20	119.59±15.08**	101.53±25.08	133.16±20.09*

a：表中數據為 6 次實驗之 Mean±S. E. M；*表示 P< 0. 05；

**表示 P< 0. 01；

(4) 脾臟細胞分泌 T_H1 型及 T_H2 型細胞激素分泌能力－
PCM、K1、K2、K3 及 K4 之作用

TH1 型免疫反應主要激發細胞性免疫反應，而 T_H2 型免疫反應主要激發體液(抗體) 性免疫反應。如表七所示，本研究檢視小鼠口服 PCM、K1、K2、K3 及 K4 之後，脾臟細胞分泌 TH1 型細胞激素(Interferon- γ ；IFN- γ) 及 T_H2 型細胞激素(Interleukin-10；IL-10)的變化；發現小鼠服用 10 mg/kg/day 及 80 mg/kg/day 之 PCM 後 IFN- γ 的分泌顯著高於控制組。服用 K1 及 K2 2.5mg/kg/day 以上，IFN- γ 的分泌顯著高於控制組；服用 5mg/kg/day 及 10mg/kg/day 之 K3 IFN- γ 的分泌

顯著高於控制組；服用 20mg/kg/day 之 K4 IFN- γ 的分泌顯著高於控制組。IL-10 的分泌在服用 PCM、K3 及 K4 之後，沒有明顯的變化，然而，服用 K1 2.5mg/kg/day 以上，K2 5mg 及 20mg/kg/day，則顯示明顯增加 IL-10 之分泌。

表七~1 脾臟細胞分泌 IFN- γ 及 IL-10 的變化-PCM, K1, K2 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	細胞激素(pg/ml)	
		IFN- γ	IL-10
控制組		254.14 \pm 55.68 ^a	103.91 \pm 20.36
PCM	10	465.11 \pm 26.6**	115.90 \pm 17.29
PCM	40	264.79 \pm 48.36	77.31 \pm 9.31
PCM	80	433.44 \pm 31.10**	181.97 \pm 33.26
K1	2.5	428.7 \pm 38.9*	170.28 \pm 13.0*
K1	5	673.33 \pm 96.73**	178.76 \pm 24.56*
K1	10	682.28 \pm 73.78**	176.17 \pm 45.24
K1	20	783.97 \pm 76.1***	334.7 \pm 45.8***
K2	2.5	414.80 \pm 31.3*	135.71 \pm 19.89
K2	5	432.70 \pm 50.22*	226.48 \pm 55.67*
K2	10	348.45 \pm 72.56*	135.62 \pm 48.15
K2	20	457.48 \pm 57.60**	195.27 \pm 40.0*

a：表中數據為 10 次實驗之 Mean \pm S.E.M；*表示 P < 0.05，

表示 P < 0.01；*表示 P < 0.001

表七~2 脾臟細胞分泌 IFN- γ 及 IL-10 的變化-K3, K4 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	細胞激素(pg/ml)	
		IFN- γ	IL-10
控制組		124.25 \pm 28.15 ^a	107.80 \pm 20.79
K3	5	917.07 \pm 130.41*	262.09 \pm 108.41
K3	10	449.74 \pm 100.67*	86.48 \pm 33.26
K3	20	176.20 \pm 45.96	98.74 \pm 27.05
K4	5	240.45 \pm 107.83	128.91 \pm 45.46
K4	10	252.26 \pm 103.76	197.39 \pm 68.73
K4	20	292.00 \pm 77.77*	155.91 \pm 26.16

a：表中數據為 6 次實驗之 Mean \pm S. E. M；*表示 P<0.05

(5) T 淋巴球 CD4⁺8⁻及 CD4⁻8⁺次族群的變化

CD4⁺CD8⁻T 細胞主要是輔助型 T 細胞(Helper T-cells)，而 CD4⁻CD8⁺主要是胞殺型 T 細胞(Cytotoxic T-cells)。如表八所示，本研究以不同濃度 PCM 餵食小鼠後，取出脾臟細胞，分離出非附著性細胞，進行免疫螢光測試。結果顯示 CD4⁺8⁻細胞所佔的比例有上升趨勢，但與控制組相較無顯著差異；不過，CD4⁻8⁺細胞所佔的比例，與控制組比較，有顯著增加的現象。由於 CD4⁺8⁻細胞也有增加的趨勢，故 CD4/CD8 比例沒有顯著變化。CD4⁻8⁺ T 細胞的增加，與脾臟細胞 IFN- γ

分泌量增加的現象相吻合，因為 CD4⁺8⁺T 淋巴球是「專一性細胞免疫反應」的主要反應細胞(effector cells)。

表八 T 淋巴球次族群的變化－PCM 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	螢光陽性細胞百分比(%)		
		CD4	CD8	CD4/CD8
控制組		23.40±2.31 ^a	12.50±0.82	1.87
PCM	10	28.67±2.54	15.31±0.72*	1.87
PCM	40	27.72±0.66	16.67±1.08**	1.66
PCM	80	29.95±2.75	16.76±1.29**	1.79

a：表中數據為 5 次實驗之 Mean±S.E.M；*表示 P<0.05，

**表示 P<0.01

(6)自然殺手細胞活性

自然殺手細胞(Nature killer cells；NK cells)為對抗腫瘤細胞及病毒感染細胞的非專一性胞殺細胞，小鼠口服 PCM 後，分離非附著性脾臟細胞，測試其所含之 NK 細胞活性。如表九所示，口服 10 mg/kg/day 之 PCM 有顯著增加 NK 細胞活性的現象，高於此劑量則沒有增強 NK 活性的現象。IFN- γ 為促進 NK 細胞活化的細胞激素，此數據也與 IFN- γ 分泌量增加的現象相吻合。

表九 自然殺手細胞活性－PCM 之作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	Target : Effector		
		1 : 12.5	1 : 25	1 : 50
控制組		16.57±0.61 ^a	17.04±1.06	16.57±0.61
PCM	10	14.24±2.18	20.78±1.25	23.12±2.86*
PCM	40	18.62±2.62	18.20±2.02	20.99±3.59
PCM	80	15.54±3.49	18.27±2.05	16.35±0.90

a：數據為目標細胞(YAC-1)死亡百分比，即 propidium iodide 陽性反應細胞比例。數據為 5 次實驗之 mean±S.E.M，*為 P<0.05

(7)腹腔巨噬細胞吞噬能力

巨噬細胞(macrophages)為免疫系統中主要的吞噬細胞之一，負責清除入侵的病原菌及體內壞死的細胞。如表十所示，本研究以 PCM 餵食小鼠後，分離出腹腔巨噬細胞(peritoneal macrophages)，再以帶有螢光之 K-12 大腸桿菌為目標細胞，觀察其吞噬能力。結果顯示，口服 40 及 80 mg/kg/day 之 PCM 後，腹腔巨噬細胞隨著 PCM 濃度增加，顯著增強對大腸桿菌的吞噬能力。

表十 腹腔巨噬細胞吞噬作用

成分	劑量 (mg/kg/day)	吞噬作用
控制組		20.88±3.90 ^a
PCM	10	17.08±1.82
PCM	40	27.49±3.99*
PCM	80	38.22±2.20 **

a: 數據為巨噬細胞有吞噬目標細胞佔所有巨噬細胞百分比，表中數據為 10 次實驗之 Mean±S.E.M；* 表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$

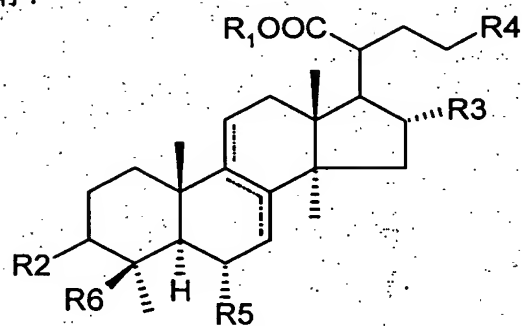
圖式簡單說明

圖一為依本發明的一實施例從茯苓製備具有改善的生物活性的低極性部位（PCM），及分離該 PCM 所含羊毛固醇（lanostane）類化合物的流程圖。

圖二為依中國第 1008183 號專利所揭示的方法從茯苓製備一種含三帖類化合物的萃取物的流程圖。

拾、申請專利範圍：

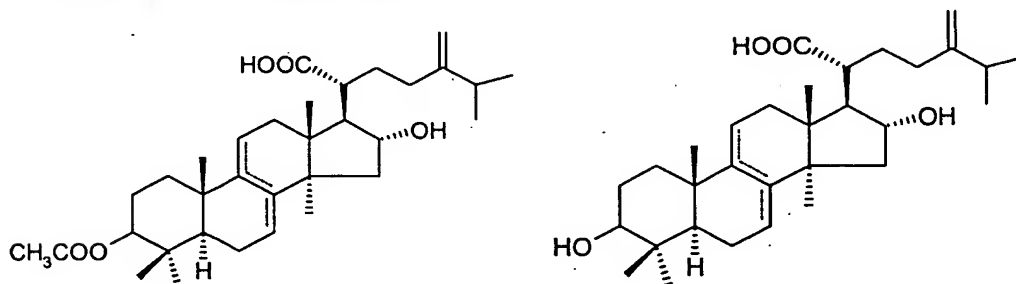
1. 一種提昇哺乳類動物免疫力的醫藥組合物，包含一提昇哺乳類動物免疫力有效量作為有效成分的具下列化學式(I)的羊毛固醇；及與該有效成分共同使用之醫藥容許載體或稀釋劑：

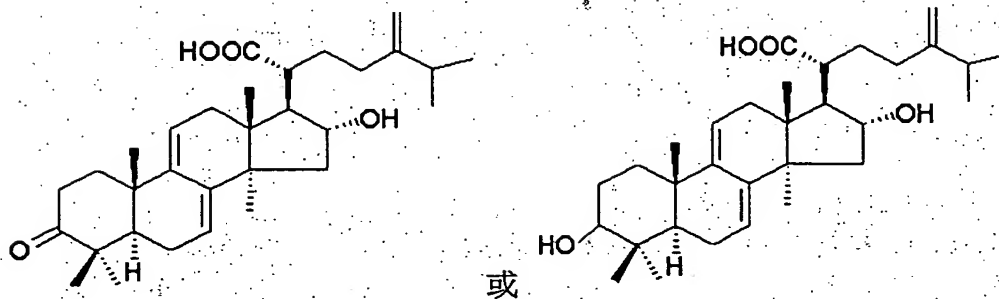


(I)

於式中 R_1 為 H 或 CH_3 ； R_2 為 $OCOCH_3$, $C=O$ 或 OH ； R_3 為 H 或 OH ； R_4 為 $-C(=CH_2)-C(CH_3)_2R_a$ ，其中 R_a 為 H 或 OH ，或 $-CH=C(CH_3)-R_b$ ，其中 R_b 為 CH_3 或 CH_2OH ； R_5 為 H 或 OH ；及 R_6 為 CH_3 或 CH_2OH 。

2. 如申請專利範圍第1項的醫藥組合物，其中該羊毛固醇(I)具有具下列化學式：





3. 如申請專利範圍第1項的醫藥組合物，其中該醫藥組合物含有1-60重量%的羊毛固醇。
4. 如申請專利範圍第1項的醫藥組合物，其中該醫藥組合物為口服的。
5. 如申請專利範圍第1項的醫藥組合物，其中該哺乳類動物為人類。
6. 一種提昇哺乳類動物免疫力的茯苓萃取物，包含5-60重量%的具申請專利範圍第1項的羊毛固醇(I)且實質上不含開環羊毛固醇。
7. 如申請專利範圍第6項的茯苓萃取物，其係由包含下列步驟的方法所製備：
 - a) 以一水，甲醇，乙醇或它們的混合溶劑萃取茯苓菌的代謝物，茯苓菌的發酵產物或茯苓菌菌絲；
 - b) 濃縮步驟a)萃取所獲得的液體；

- c) 將步驟a)所獲得的濃縮物導入一矽膠管柱；
- d) 以一低極性沖提劑(eluent)沖提該矽膠管柱，及收集所產生的溶離液(eluate)；及
- e) 濃縮步驟d)的溶離液。

8. 如申請專利範圍第7項的茯苓萃取物，其中從步驟e)所獲得的溶離液的濃縮物以矽膠薄層層析法分析具有一層析值(Rf) ≥ 0.1 ，其中以紫外光燈及碘作檢側，展開液為二氯甲烷：甲醇 = 96:4。

9. 如申請專利範圍第7項的茯苓萃取物，其中步驟a)的萃取所使用的溶劑為95%酒精。

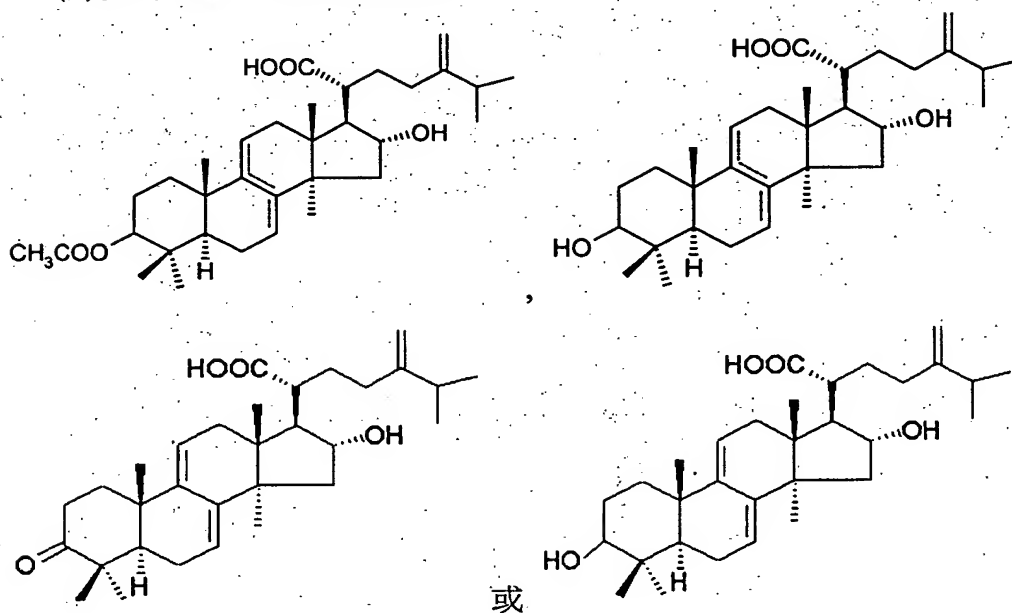
10. 如申請專利範圍第9項的茯苓萃取物，其中步驟b)的濃縮物被進一步以一體積比為1:1的甲醇及正己烷的兩相溶劑萃取；分離出甲醇層；及濃縮該甲醇層，所獲得的濃縮物被用作為步驟c)的矽膠管柱的進料。

11. 如申請專利範圍第7項的茯苓萃取物，其中步驟d)的低極性沖提劑為體積比為96.5:3.5的二氯甲烷及甲醇的混合溶劑。

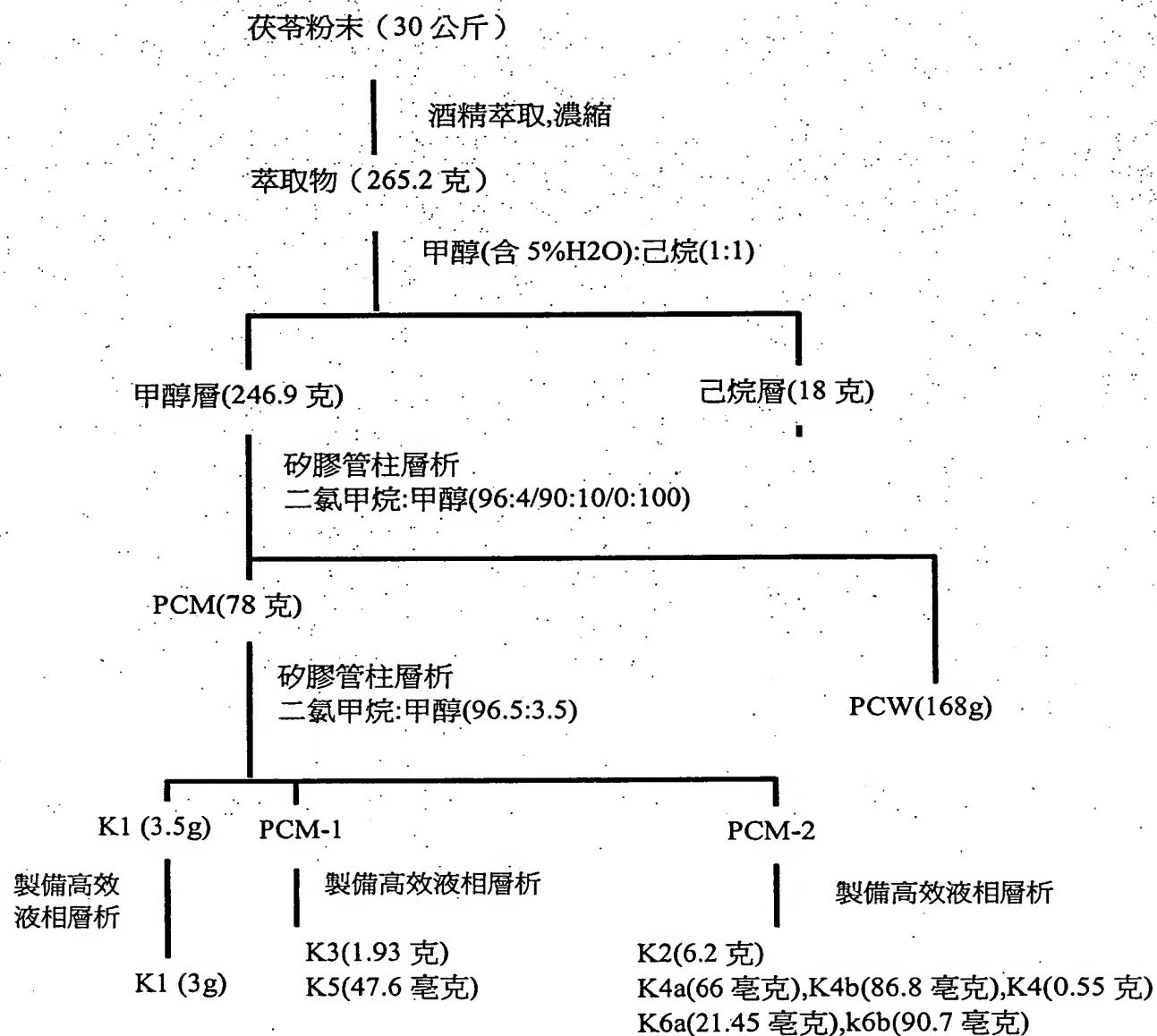
12. 如申請專利範圍第6項的茯苓萃取物，其包含10-20重量%的羊毛固醇(I)。

13. 如申請專利範圍第6項的茯苓萃取物，其中該羊毛固醇

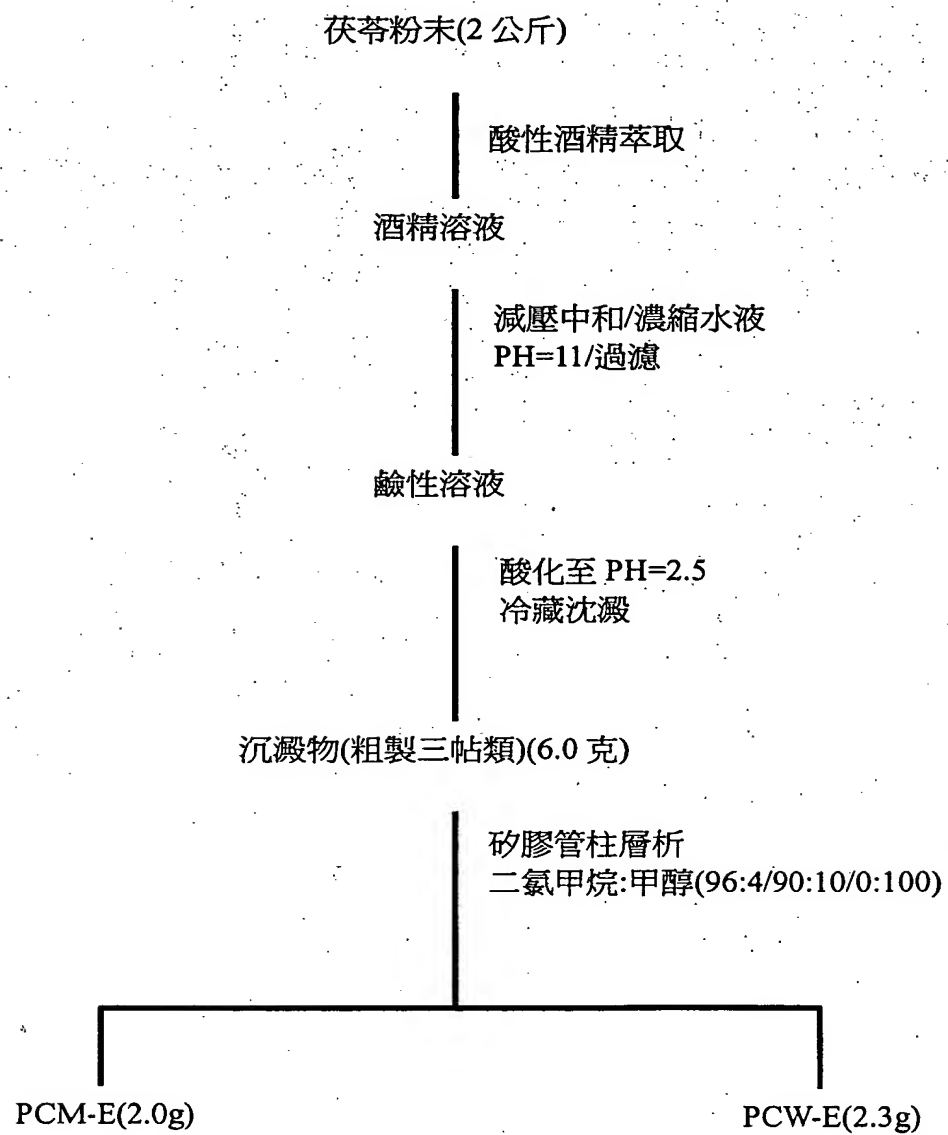
(I)具有具下列化學式：



拾壹、圖式：



圖一



圖二